Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität
München.
Vorstand: Professor Dr. Stepp.

# Vergleichende Versuche über die Hemmung der Dopareaktion durch die Vitamine B 1, B 2, C und andere Redoxpotentiale mit Berücksichtigung der Einwirkung von Kupfer, Eisen und Arsen.

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

**Hans Walter Wirth**
aus Mainz a. Rh.

1937

Buchdruckerei Hohenhaus, Marquartstein i. Chiemgau
(bisher München, Landwehrstr. 29).

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

## Inhaltsverzeichnis.


1. Problemstellung.
2. Bisherige Untersuchungen über die Hemmung der normalen und pathologischen Pigmentierungen durch Vitamin C.
3. Bisherige Untersuchungen über den hemmenden Einfluß des Vitamin C auf die Dopareaktion.
4. Unsere Versuchsanordnungen.
5. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß der l.-Ascorbinsäure und der Araboascorbinsäure auf die Dopareaktion.
6. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß anderer Redoxpotentiale auf den Ausfall der Dopareaktion.
7. Die Einwirkung von Kupfer, Eisen und Arsen auf die Dopareaktion und auf die hemmende Wirkung des Vitamin C und der Araboascorbinsäure.
8. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß des Glutathions und Cysteins auf die durch Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure stabilisierte Dopalösung.
9. Stellungnahme zu unseren Versuchsergebnissen.
10. Zusammenfassung.

## 1. Problemstellung.

In der medizinischen Forschung der letzten Jahre wurde der Frage der Beziehungen einzelner Hormone und Vitamine zum Pigmentstoffwechsel eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Im Vordergrund stand dabei die Wirkung des Vitamin C auf normale und pathologische Pigmentierungen, sowie auf den Ausfall der Bloch'schen Dopareaktion. Dabei wurde die Frage aufgeworfen, wie die Hemmung der Dopareaktion durch das Vitamin C und die depigmentierende Wirkung dieses Vitamins zu erklären sind.

Für eine Beziehung zwischen Pigmentierung und Vitamin C sprachen verschiedene klinische Beobachtungen, bei denen eine Beeinflussung von pathologischer Pigmentation durch das Vitamin C gesehen wurden. Außerdem wußte man schon lange, daß die Nebennieren in Beziehung zur Pigmentation stehen müssen, da im Gefolge einer Addison'schen Erkrankung starke Pigmentationen aufzutreten pflegen. Bei diesem Krankheitszustand handelt es sich meistens um eine chronische Insuffizienz beider Nebennieren, die in den meisten Fällen durch Tuberkulose, aber auch durch Lues und Tumoren bedingt ist. Neben den Pigmentanomalien ist das vollständige Darniederliegen des Adrenalinstoffwechsels bei der Addison'schen Erkrankung bekannt. Es war daher naheliegend anzunehmen, daß auch die Pigmentierung der Haut durch diese Störung im Adrenalinhaushalt verursacht ist.

Experimentelle Untersuchungen konnten dann auch zeigen, daß durch gewisse Fermente aus dem Hormon der Nebenniere, dem Adrenalin, ein schwarzer Farbstoff gebildet werden kann.

Ein Teil der Autoren nimmt deshalb an, daß die Muttersubstanzen des Adrenalins bei Morbus Addison nicht in Adrenalin umgewandelt werden können, daß vielmehr diese Brenzkatechinderivate durch eine fermentative Umwandlung zu Melanin werden. Hierauf baut sich die Bloch'sche Theorie der Hautpigmentbildung und die Bloch'sche Dopareaktion auf. Bloch nimmt für die Adrenalin- und Melaninentstehung eine gemeinsame Muttersubstanz an, die aus dem Brenzkatechinstoffwechsel stammt. Als Entstehungsort des Adrenalins wird heute die Nebennierenrinde angenommen: Die Melaninbildung findet in den Basalzellen pigmentbildungsfähiger Haut statt. In diesen ektodermalen Zellen findet sich ein Ferment, die Dopaoxydase, die die farblosen Pigmentvorstufen in das melanotische Pigment überführt.

Bloch nimmt als Pigmentvorstufe das 3,4 Dioxyphenylalanin, andere Forscher das Tyrosin an, beides natürliche Abbauprodukte des Eiweißes. Nach neueren Untersuchungen entsteht durch Einfürung einer weiteren Hydroxylgruppe in das Tyrosin 3,4 Dioxyphenylalanin. Damit sind beide Theorien der Pigmententstehung aus Tyrosin oder 3,4 Dioxyphenylalanin auf einen Nenner gebracht. Der weitere Weg der Pigmententstehung von 3,4 Dioxyphenylalanin bis zum fertigen Melanin ist noch nicht in allen seinen Phasen erkannt worden. Fest steht aber, daß es sich dabei um eine fermentative Oxydation handelt.

Die nahe chemische Verwandtschaft der eben beschriebenen Pigmentvorstufen mit dem Adrenalin ergibt sich sofort aus der Betrachtung der Konstitutionsformeln. Die Muttersubstanzen der Pigmentvorstufen und des Adrenalins sind also identisch. Melanin und Adrenalin sind demnach 2 Endprodukte des Brenzkatechinstoffwechsels, zumal Melanin ebenfalls, wenn auch wesentlich geringer, die gefäßverengende und blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins besitzt.

Nach Bloch wird also das Pigment in der Haut, in den Hautanhängen und im Auge durch ein spezifisches Ferment, die Dopaoxydase, aus Zwischensubstanzen der Brenzkatechinreihe

gebildet. Diese Theorie hat im Laufe der Zeit immer mehr Stützen durch die weiteren Untersuchungen erhalten. Bloch fand in allen pigmentbildenden Zellen ein spezifisches Ferment, das imstande ist, das 3,4 Dioxyphenylalanin in ein melaninartiges Produkt umzuwandeln. Später konnte einwandfrei die optische Spezifität der Dopaoxydase nachgewiesen werden.

Ob der Ausgangspunkt der Pigmentbildung das 3,4 Dioxypyhenylalanin selbst ist, steht noch nicht einwandfrei fest. Bestimmt ist es aber ein Körper der Brenzkatechinreihe.

Nach dieser Bloch'schen Theorie der Pigmententstehung lassen sich sowohl physiologische wie pathologische Pigmentierungen erklären. Die Dopareaktion ergibt allerdings weder über die Konstitution noch über die Herkunft des Melanins oder seiner Vorstufen Auskunft, sondern beweist nur die Anwesenheit der spezifischen Dopaoxydase. Bei positivem Ausfall der Dopareaktion tritt in den pigmentbildenden Zellen der Basalschicht der Gefrierschnitte eine vermehrte Pigmentansammlung auf. Diese Ansammlung kann so stark sein, daß man makroskopisch den positiven Ausfall an den dunklen Epithelleisten der Schnitte ablesen kann.

Nachdem es von Szent Györgi gelungen war, das Vitamin C zu isolieren, konnte er nachweisen, daß das Vitamin C imstande ist, in vitro die Melaninbildung zu verhindern. Schon früher konnte er einen Zusammenhang zwischen der bräunlichen Pigmentierung des Laubes und der Früchte und dem Vitamin C feststellen. Klinische Beobachtungen zeigten tatsächlich, daß die Addison-Pigmentierung deutlich auf Vitamin C-Gaben abblaßte.

## 2. Bisherige Untersuchungen über die Hemmung der normalen und der pathologischen Pigmentierungen durch Vitamin C.

Die auffälligen Pigmentierungen bei der Addison'schen Erkrankung deuten, wie bereits erwähnt, auf eine Beziehung der Nebennieren zur Pigmentation der Haut hin. Unerklärlich

blieben aber die Addison-ähnlichen Pigmentierungen, die bei chronischen Störungen im Magen-Darm-Kanal, z.B. Gastroenteritis, Magencarcinom, Pankreaserkrankungen und der Anaemia perniciosa auftraten, dabei aber keine sicheren krankhaften Veränderungen an den Nebennieren erkennen ließen. (Diehl).

Nun teilte Szent-Györgi, wie bereits erwähnt, als erster die bemerkenswerte Tatsache mit, daß Vitamin C befähigt ist, die Hyperpigmentation bei Addison merklich abzuschwächen, ohne allerdings die Krankheit selbst irgendwie therapeutisch zu beeinflussen. Später stellte Morawitz eine Abblassung einer Hyperpigmentation bei einem Fall von chronischer Enterokolitis fest, bei dem die Pigmentanomalien schon über $1^1/_2$ Jahre bestanden haben. Bei vitaminreicher Behandlung sah Morawitz ein fast völliges Verschwinden der Pigmentflecke. Diese Beobachtungen legten den Gedanken einer engen Beziehung zwischen Pigmentbildung und Vitamin C nahe.

In der Folge wurden nun verschiedene Beobachtungen über die Abblassung von Pigmentierungen nach Vitamin C-Gaben berichtet, die sich aber zum größten Teil widersprechen. So konnten W. von Drigalski, Fantl und Fessler, Tenchio, Jadasohn, Schaaf keinerlei Einfluß von Vitamin C Darreichung auf Hyperpigmentierungen verschiedener Genese feststellen, während sie teilweise aber ein deutliches Zurückgehen der Addison-Pigmentierung sahen. Dagegen sahen aber auch bei Pigmentierungen anderer Genese als die bei der Addison-Erkrankung zahlreiche andere Untersucher eine deutliche Abblassung der bestehenden Pigmentierungen.

So berichtete Hoff, daß Pigmentierungen, die im Verlauf von Skorbut, Magencarcinom, chronischer Pankreaserkrankungen und bei der perniciösen Anaemie auftreten, sehr gut auf große Dosen von Vitamin C ansprechen. Schröder und Einhauser konnten pathologische Pigmentierungen bei Gastroenteritis und Achylia gastrica mit Vitamin C-Behandlungen sehr günstig beeinflussen. Sie beobachteten weiterhin bei einer Kranken mit

einem Chloasma uterinum eine deutliche Abblassung der bräunlichen Verfärbung des Gesichtes. Schade sah auf Vitamin C-Behandlung sowohl ein deutliches Zurückbleiben des Bestrahlungserythems als auch der darnach auftretenden Pigmentation. Er folgerte daraus, daß „dem Vitamin C eine Kapillarwirkung zukommen müsse, da ja auch besonders bei dem Vitamin C Mangelkrankheiten z. B. Skorbut, Kapillarschäden gefunden werden." Ob der Einfluß der Vitamin C Wirkung auf die Pigmentierung ein direkter ist oder ob er ganz oder teilweise über die Kapillarfunktion geht, kann nach seiner Meinung nicht entschieden werden. Selley konnte ein Chloasma uterinum mit Vitamin C zum Verschwinden bringen. Szüle behandelte eine Addison-Pigmentierung mit Cortydin und Zitronensaft mit sehr gutem Erfolg.

### 3. Bisherige Untersuchungen über den hemmenden Einfluß des Vitamin C auf die Dopareaktion.

Nach Bloch besteht zwischen der natürlichen Pigmentbildung und dem Auftreten der Dopareaktion ein ganz strenger Parallelismus. An dem Ausfall der Dopareaktion müßte man bei Einwirkung der 1. Ascorbinsäure — wenn das Vitamin C auf die Pigmentierung irgend einen Einfluß besitzen sollte — eine Änderung feststellen können.

Schröder untersuchte als erster den Einfluß des Vitamin C auf die Dopareaktion und sah eine Hemmung der Reaktion. Grüneberg und Schade konnten diese Versuche vollauf bestätigen. Sie gingen einen Schritt weiter und suchten den Angriffspunkt des Vitamin C bezw. den Wirkungsmechanismus der hemmenden Ascorbinsäure zu erklären.

Dabei ließen sie in ihren Versuchen zuerst die Ascorbinsäure, die sie mit Natr. bicarbonat neutralisierten mit und ohne Puffer vor Zusatz des Dopas auf die Schnitte einwirken. Darauf folgte eine Wässerung in absolut reinem Wasser, um das zuge-

setzte Vitamin C möglichst restlos wieder zu entfernen. Diese so vorbehandelten Schnitte wurden dann in Dopalösung gebracht. An diesen Schnitten konnten sie keinerlei Hemmung beobachten und sie schließen aus diesem Untersuchungsergebnis, daß die Hemmung der Dopareaktion nicht durch eine Beeinflussung der Dopaoxydase in den Zellen zustande kommt. Ihnen zufolge greift das Vitamin C im Organismus nicht in den pigmentbildenden Zellen in den Wirkungsmechanismus der Pigmentbildung ein.

Fantl und Fessler wiederholten die Schröder'schen Untersuchungen und konnten bestätigen, daß Vitamin C die Bloch'sche Reaktion hemmt. Sie fanden aber eine Hemmung der Reaktion nur bei so hohen Konzentrationen von Vitamin C, wie sie physiologisch nie vorkommen dürften. Sie erklären daher die Wirkung der Hemmung der Dopareaktion mit der starken Reduktionskraft der Ascorbinsäure.

Zur Bildung von Dopamelanin ist außer dem Melanogen (3,4 Dioxyphenylalanin) und dem Ferment (Dopaoxydase) noch Sauerstoff notwendig. Es ist nun bekannt, daß die Ascorbinsäure zu den stärksten Redoxsystemen gehört, die im menschlichen Körper vorkommen. Es bestehen daher bei der Bloch'schen Reaktion zwei konkurrierende Oxydationssysteme:

1. Die Ascorbinsäure, die sehr leicht Sauerstoff aufnehmen kann und dabei reversibel oxydiert wird.

2. Das Dopa, das sich bei Anwesenheit von Sauerstoff ebenfalls sehr leicht oxydiert, um dabei eine dunklere Farbe anzunehmen.

Grüneberg und Schade vermuten nach ihren Untersuchungen, daß die Hemmung der Dopareaktion durch die Ascorbinsäure einfach durch eine chemische Umsetzung des Dopas geschieht, das dadurch für die Reaktion unbrauchbar wird.

Fantl und Fessler haben bei ihren Untersuchungen gesehen, daß die Hemmung der Dopareaktion nur bei unphysiologisch hohen Vitamin C-Konzentrationen in den Schnitten

eintraten. Ganz dazu im Widerspruch stehen die Ergebnisse, die von Szent Györgi mitgeteilt wurden. Er sah, daß Vitamin C imstande ist, schon in einer Konzentration von 1:0,0000025 eine Pigmentbildung vollkommen zu verhindern.

Ein Teil der Untersucher nimmt also an, daß das Vitamin C kraft seiner größeren Reaktionsgeschwindigkeit den vorhandenen Sauerstoff an sich reißt und ihn somit von dem Dopa ablenkt. Dadurch tritt eine vollkommene Hemmung der Dopareaktion ein. Sie halten das Vitamin C für einen Stabilisator des 3,4 Dioxyphenylalanins und glauben für diese Anschauung auch den hemmenden Einfluß des Vitamin C auf die Autooxydation der Dopalösung und auf die chemische Melaninbildung (Oxydation von Phenolen) durch die Ascorbinsäure anführen zu können.

## 4. Unsere Versuchsanordnungen.

Wir hielten uns bei der Ausführung der Dopareaktion an die Angaben von Bloch, nur setzten wir etwas mehr Phosphatpuffer zu der Reaktionsflüssigkeit zu, um eine einwandfreie Konstanz der H-Ionenkonzentration zu garantieren.

Zu allen unseren Versuchen verwendeten wir eine 1‰ Lösung von 3,4 Dioxyphenylalanin (Merck). Der Phosphatpuffer wurde nach der Tabelle von Sörensen auf ein pH von 7,347 eingestellt und mit dem Jonometer nachgeprüft.

Die Gefrierschnitte von gescheckten Meerschweinchenohren wurden 3 – 6 Stunden nach dem Tode bei Zimmertemperatur bis zu 24 Stunden einer 1‰ Dopalösung ausgesetzt.

Da die 10 $\mu$ dicken, nicht fixierten Schnitte in den Lösungen stark beschädigt wurden — die Epithelleisten lösten sich vom Unterhautzellgewebe oder sie schlugen sich übereinander — war eine genaue Lokalisation der Pigmentation d. h. der positiven Bloch'schen Dopareaktion nur schwer festzustellen. Aus

diesem Grunde nahmen wir später zu unseren Versuchen Schnitte von 30 $\mu$ Dicke. Dadurch war es möglich, den Zusammenhang der Schnitte bezw. der Lage der Epithelleisten zu wahren und eine einwandfreie Lokalisation der positiven Bloch'schen Reaktion zu erhalten.

### 5. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß der l. Ascorbinsäure und der Araboascorbinsäure auf die Dopareaktion.

Maurer und Schiedt stellten synthetisch aus dem Methylester der 2-Ketogluconsäure eine Isomere der Ascorbinsäure mit bisher unbekannter Konstitution dar. Diese sog. Maurer'sche Säure oder Araboascorbinsäure ist bei oraler Anwendung 1 : 40, bei subkutaner 1 :20 geringer antiskorbutisch wirksam als die l. Ascorbinsäure.

Nun hat bekanntlich Kühnau bei seinen Untersuchungen über die gerinnungshemmende Wirkung der l. Ascorbinsäure und ihrer Homologen gefunden, daß die blutgerinnungsfördernde Wirkung unabhängig von der antiskorbutischen Wirksamkeit allen Homologen der Ascorbinsäure gemeinsam ist und sehr wahrscheinlich auf der reduzierenden Wirkung dieser Körper beruht.

Wir stellten uns daher die Frage, ob die Araboascorbinsäure ebenfalls in der Lage ist, die Dopareaktion zu hemmen. Uns interessierte dabei besonders, ob die dopahemmende Wirkung der Araboascorbinsäure mit ihrem antiskorbutischen Wirksamkeitsgrad, gemessen an der l. Ascorbinsäure, übereinstimmt.

Zu allen unseren Versuchen verwandten wir die gleichen Versuchsmengen und zwar:

20 ccm 1 $^0/_{00}$ Dopalösung
2 ccm Phosphatpuffer mit einem pH von 7,347
1 ccm der zu untersuchenden Lösungen in verschiedenen Konzentrationen.

Die Konzentration an Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure betrug 0,2—108 mg % in der Gesamtlösung.

Die beiden folgenden Tabellen zeigen den Ausfall unserer Versuche mit Vitamin C und Araboascorbinsäure.

Tab. 1) Hemmung der Melaninbildung.

| mg % | 108 | 54 | 27 | 13,5 | 6 25 | 3.13 | 1,56 | 0.78 | 0,4 | 0.2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ascorbinsäure | — | — | — | — | — | ± | + | + | + | + |
| Arabaascorbinsäure | — | — | — | — | (±) | ± | + | + | + | + |

Tab. 2) Hemmung der Dopareaktion in Gewebsschnitten.

| mg % | 108 | 54 | 27 | 13,5 | 6,25 | 3.13 | 1 56 | 0.78 | 0,4 | 0,2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ascorbinsäure | — | — | — | — | — | — | + | + | + | + |
| Araboascorbinsäue | — | — | — | — | — | — | + | + | + | + |

Ein — bedeutet vollkommene Hemmung, ± eine deutliche Abschwächung, + bezeichnet einen positiven Ausfall des Dopaleerversuches.

Nach Bloch tritt in allen Dopalösungen, die eine neutrale oder alkalische Reaktion besitzen, eine braune Verfärbung der Lösung ein. Diese Trübung bleibt aus, wenn die Reaktion der Dopalösung sauer ist. Der Farbstoff, der diese diffuse Braun-

färbung bedingt, entsteht durch Autooxydation des Dopas. In den Schnitten tritt ebenfalls durch eine einfache Adsorption bezw. Imbibition des in der dunkelnden Flüssigkeit gelösten Farbstoffes an das Bindegewebe der Cutis eine diffuse braune Verfärbung ein, die mit der Verweildauer der Schnitte in den Lösungen proportional zunimmt.

Bei einem Zusatz von 1. Ascorbinsäure bleibt neben der Hemmung der Dopareaktion (Tab. 2) auch die durch Autooxydation bedingte Verfärbung der Reaktionsflüssigkeit, trotz gleichbleibenden H-Ionenkonzentrationen aus, und die Lösungen bleiben hell und klar. (Tab. 1). Hingegen tritt immer, wenn die Dopareaktion in den Basalzellen der Hautschnitte positiv ausfällt, auch die Braunfärbung der Lösung ein.

Bei unseren Untersuchungen fand also eine vollständige Hemmung der Autooxydation der Dopalösung bis zu einer Konzentration von 6,25 mg% Vitamin C statt. Eine Abschwächung der Autooxydation trat noch bei einer Vitamin C-Konzentration von 3,1 mg% auf.

In den Schnitten selbst wurde die Dopareaktion erst bei einem Vitamin C-Gehalt der Lösung von 1.5 mg% positiv, während sie durch alle höheren Konzentrationen gehemmt wurde.

Die Werte der Vitamin C-Konzentrationen, die eine Hemmung der Dopareaktion verursachen, liegen also zwischen 3,12 mg% und 1,56 mg%. Übrigens haben die Untersuchungen von Fantl und Fessler das gleiche Ergebnis. Diese Autoren stellten fest, daß das Vitamin C nur in einer Konzentration, die höher als 2 mg% ist, die Melaninbildung in vitro zu hemmen imstande ist.

Ähnlich verhielten sich die Melaninbildung und die Dopareaktion bei Zusatz von Araboascorbinsäure. Bei dieser verwandten wir genau die gleichen Konzentrationen in unseren Versuchen wie bei Vitamin C.

In der Versuchsreihe mit Araboascorbinsäure blieb die Autooxydation ebenfalls bis zu einer Konzentration von 6,25 mg% aus, jedoch mit dem Unterschied, daß man gerade bei dieser Konzentration den Beginn der Autooxydation feststellen konnte. Bei einer Konzentration von 3,125 mg% Araboascorbinsäure zeigte sich genau dieselbe Abschwächung der Dopareaktion wie wir sie bei gleichem Zusatz von Vitamin C beobachtet haben. Alle Konzentrationen, die unter 3,125 mg% Araboascorbinsäure lagen, zeigten keinerlei Unterschied gegenüber dem Dopaleerversuch.

In den Schnitten wurde die Dopareaktion bei Zusatz von Araboascorbinsäure ebenfalls bei den gleichen Konzentrationen wie bei Vitamin C-Zusatz gehemmt, sodaß man also annehmen kann, daß der antiskorbutische Faktor nicht die Hemmung der Dopareaktion bewirkt.

## 6. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß anderer Redoxpotentiale auf den Ausfall der Dopareaktion.

Fantl und Fessler glauben die hemmende Wirkung des Vitamin C auf die Dopareaktion mit dem Redoxpotential dieses Stoffes erklären zu können. Sie nehmen an, daß das Vitamin C den zur Melaninbildung notwendigen Sauerstoff dem 3,4 Dioxyphenylalanin entzieht, sodaß sowohl die Autooxydation als auch die fermentative Oxydation des Dopas nicht eintreten kann.

Wir versuchten diese Frage dadurch zu lösen, daß wir außer dem Vitamin C noch andere Redoxpotentiale, die ebenfalls physiologisch vorkommen, wie z. B. Cystein, Glutathion, Laktoflavin heranzogen und auf die Dopareaktion einwirken ließen.

Wenn die Hemmung der Dopareaktion durch das Vitamin C wirklich auf seiner Redoxwirkung beruht, so müßten auch die anderen Redoxsysteme fähig sein, die Dopareaktion zu hemmen.

Wir stellten wiederum Reihenversuche an, bei denen die Versuchsbedingungen dieselben wie in allen vorausgegangenen Versuchen waren:

20 ccm 1 $^0/_{00}$ Dopalösung
2 bezw. 1 ccm Phosphatpuffer pH 7,347
1 ccm Lösung von obengenannten Redoxkörpern, in der einen Versuchsreihe im Verhältnis 1 : 2 in der anderen Reihe 1 : 10 in der Konzentration fallen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 niedergelegt.

Da bei unseren Versuchen die Dopareaktion in den Hautschnitten vollkommen der Melaninbildung in vitro entsprach, können beide Tabellen sowohl für die Autooxydation, als auch für die fermentative Oxydation des Dopas in Gewebs-Schnitten herangezogen werden.

Tab. 3. Ausfall der Dopareaktion und der Melaninbildung bei Zusatz von Cystein und Glutathion.

| mg $^0/_0$ | 108 | 54 | 27 | 13.5 | 6.25 | 3.13 | 1,56 | 0,78 | 0.4 | 0,2 | 0.1 | 0.05 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cystein | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glutathion | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Tab. 4

| mg $^0/_0$ | 43,5 | 4,35 | 0.435 | 0.0435 | 0.00435 | 0.000435 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cystein | + | + | + | + | + | |
| Glutathion | | + | + | + | + | + |

Bei keiner Konzentration trat also eine Änderung der Autooxydation der Lösungen und der fermentativen Oxydation in den Gewebsschnitten gegenüber dem Dopaleerversuch ein.

Etwas anders verhielt sich das Laktoflavin, während das Vitamin B 1 ebenfalls keine Änderung der Dopareaktion hervorrief.

Tab. 5. Ausfall der Dopareaktion und der Melaninbildung bei Zusatz von Laktoflavin und Vitamin B 1.

| mg % | 21,7 | 2,17 | 0,217 | 0,0217 | 0,00217 | 0,000217 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Laktoflavin | | ++ | ++ | ++ | + | + |
| Betabion | + | + | + | + | + | |

Laktoflavin ließ bei Konzentrationen von 2 mg%, 0,2 mg% und 0,02 mg% die trotz der hohen Verdünnungen noch deutlich gelbe Verfärbung zeigten, eine verstärkte Dopareaktion in den Schnitten und eine verstärkte Melaninbildung erkennen, die wir in der Tabelle 5 mit ++ bezeichneten.

Neben diesem Vitamin B 2 untersuchten wir auch das Vitamin B 1. (Betabion). Auch dieses rief keinerlei Hemmung der Dopareaktion hervor.

## 7. Die Einwirkung von Kupfer, Eisen und Arsen auf die Dopareaktion und auf die hemmende Wirkung des Vitamin C bezw. der Araboascorbinsäure.

### a) Kupfer:

Uichiro Sarata teilte vor einiger Zeit mit, daß ein Zusatz von Kupfersulfat eine Beschleunigung der Dopaoxydation in wässeriger Lösung hervorruft. Er glaubt, daß der Kupfergehalt der Haut in einer Beziehung zur Pigmentation steht, da

die pigmentierte Haut bedeutend mehr Kupfer enthält, als die nicht pigmentierte. Trotzdem nimmt Sarata nicht an, daß Kupfer im Melaninmolekül vorhanden ist. Er glaubt vielmehr, daß das Kupfer bei der Entstehung des Melanins eine Rolle als Katalysator spielt, da er feststellen konnte, daß Kupfer in den jungen Zellen der Haut in größerer Menge enthalten ist. Diese Annahme steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Haut unter pigmentierten Haaren im allgemeinen mehr Kupfer enthält als unter hellen Haaren.

Sarata fand ferner, daß die Oxydation des Dopas gerade bei der Konzentration am stärksten beschleunigt wird, die den Kupfergehalt des menschlichen Blutes entspricht, nämlich bei 0,0912—0,1081 mg%.

Cunningham hat berichtet, daß die Oxydation von 3.4 Dioxyphenylalanin durch Hautextrakte von neugeborenen Tieren bei Zugabe von Kupfer beschleunigt wird. Ferner sah er, daß bei Kupferverfütterung der Anstieg des Kupfergehaltes in der Haut und in den Haaren größer war, als in allen anderen Organen.

Ausgehend von diesen Befunden untersuchten wir noch einmal die Wirkung des Kupfers auf die Dopareaktion und fanden in der Tat, daß Kupfer die Dopareaktion stark beschleunigt. Man kann schon nach kurzer Zeit den Unterschied im Ausfall der Reaktion gegenüber Lösungen und Schnitten mit und ohne Kupferzusatz sehen. Sowohl die fermentative Oxydation als auch die Autooxydation gingen zeitlich und was die Stärke der Melaninbildung betrifft, bedeutend schneller bezw. intensiver vor sich als ohne Kupferzusatz.

Daß Kupfer allein keine Verfärbung der Schnitte hervorbringen kann, stellten wir durch Kupfer-Phosphatpufferversuche ohne Dopazusatz fest. Zu einer Lösung von 10 ccm Phosphatpuffer (pH 7,347) und 10 ccm Kupfersulfat setzten wir Gefrierschnitte zu. Die Konzentrationen des Kupfersulfates betrugen auf die Gesamtlösung bezogen 1,0%, 0,1%, 0,005% und 0,0001%.

In allen Schnitten traten keinerlei Änderungen ein, selbst bei einer Beobachtungszeit von 144 Stunden konnten in den pigmentbildenden Zellen keine Veränderungen festgestellt werden.

Von ganz besonderem Interesse war für uns die Frage der Einwirkung des Kupfers auf die durch Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure hervorgerufene Hemmung der Dopareaktion, besonders deshalb, weil bekanntlich Ferri- und Cupri-Ionen die Wirkung der Ascorbinsäure auf verschiedene Enzyme zu beeinflussen vermögen.

In einer ersten Versuchsreihe setzten wir zu den fallenden Konzentrationen von Vitamin C und Araboascorbinsäure bei jedem Versuch noch Kupfersulfat und zwar 0,2 mg% in der Gesamtlösung jedes einzelnen Versuches zu. Alle übrigen Versuchsbedingungen waren wiederum dieselben: 20 ccm 1‰ Dopalösung, 2 ccm Phosphatpuffer (pH 7,347).

Tab. 6. Ausfall der Dopareaktion bei Zusatz von Vitamin C oder Araboascorbinsäure und 0,2 mg% Kupfersulfat.

| mg% | 104 | 52 | 26 | 13 | 7,5 | 3,25 | 1,6 | 0,8 | 0,4 | 0,2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vitamin C | — | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Arabo ascorbinsäure | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Bei einer Konzentration von 104 mg% Vitamin C bleibt die Autooxydation und die Dopareaktion aus, hingegen tritt bei 104 mg% Araboascinsäure die Autooxydation ein, jedoch unterbleibt die Dopareaktion in den Schnitten.

Kupfer hebt also in einer Konzentration, die allerdings etwas über den Wert der Kupferkonzentration des menschlichen Serums liegt, die hemmende Wirkung des Vitamins C und der Araboascorbinsäure auf.

Wir stellten weiterhin Versuche mit einer 0,1 mg% Kupfersulfatlösung an, da diese ungefähr dem Kupfergehalt des menschlichen Blutes entspricht.

Tab. 7. Ausfall der Dopareaktion bei Zusatz von Vitamin C oder Araboascorbinsäure und 0,1 mg% Kupfersulfat.

| mg% | 208 | 20.8 | 2.08 | 0,208 | 0.0208 |
|---|---|---|---|---|---|
| Vitamin C | – | – | + | + | + |
| Arabo-ascorbin-säure | – | ± | + | + | + |

Bei einem Kupfergehalt von 0,1 mg% tritt eine Hemmung der Autooxydation der Dopareaktion bei einer Vitamin C-Konzentration von 208 bis 20,8 mg% ein.

Bei einem Zusatz von 20,8 mg% Araboascorbinsäure trat eine abgeschwächte Autooxydation ein, die Dopareaktion in den Schnitten war bei dieser Konzentration negativ ausgefallen.

b) Eisen:

Neben dem Kupfer untersuchten wir die Eisenwirkung auf den Ausfall der Dopareaktion, da bekanntlich einige Pigmente eisenhaltig sind.

Die Bloch'sche Reaktion konnte bei Eisenkonzentrationen von 0,1 mg% steigend bis zu 1,0% nicht verändert werden.

Uns interessierte noch die Einwirkung von Eisen auf die Vitamin C- bezw. Araboascorbinsäurewirkung.

Tab. 8. Ausfall der Dopareaktion bei Zusatz von Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure und 2,2 mg% Ferrisulfat.

| mg% | 208 | 20,8 | 2,08 | 0.208 | 0.0208 |
|---|---|---|---|---|---|
| Vitamin C | – | | | + | + |
| Araboascorbinsäure | – | – | ± | + | + |

Eisen kann die hemmende Wirkung der Ascorbinsäure und Araboascorbinsäure nicht aufheben. Bei einer Konzentration von 2.08 mg% Araboascorbinsäure tritt gerade eben eine abgeschwächte Dopareaktion auf.

Der Eisen-Vitamin C-Versuch zeigte bei den Konzentrationen von 208, 20.8 und 2.08 mg% eine Änderung in der Farbe. Die helle klare Flüssigkeit zeigte einen leicht violetten Farbton, der aber keine Ähnlichkeit mit der Farbe des Oxydationsproduktes des 3.4 Dioxyphenylalanins hatte. Die Schnitte hatten diese Verfärbung der Lösung nicht angenommen; die Dopareaktion war in den Schnitten nicht eingetreten.

### c) Arsen:

Es ist schon lange bekannt, daß Arsen bei längerer Darreichung eine Melanose der Haut hervorrufen kann, und zwar nimmt man an, daß diese auf einer übermäßigen Melaninbildung in den Basalzellen der Epidermis beruht. Arsen liefert durch Steigerung des Eiweißzerfalles bezw. Abbaues eine große Menge Pigmentvorstufen von Tyrosin und Dioxyphenylalanin, die dann durch die Dopaoxydase in Melanin übergeführt werden.

Aus diesem Grunde prüften wir die Wirkung des Arsens auf den Ausfall der Dopareaktion. Wir setzten Arsen in einer Konzentration von 0,1 mg% bis zu 1,0% zur Dopalösuug zu. Die Versuche fielen vollkommen negativ aus, d. h. Arsen hat keinen Einfluß auf den Ablauf der Dopareaktion.

Die Versuche mit Arsen und Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure zeigten, daß Arsen nicht fähig ist, die stabilisierende Wirkung dieser beiden Körper aufzuheben.

## 8. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß des Glutathions und Cysteins auf die durch Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure stabilisierte Dopalösung.

Zum Schluß haben wir noch Versuche mit gleichzeitiger Einwirkung von mehreren Redoxkörpern auf die Dopareaktion angestellt, da es denkbar wäre, daß zwischen den einzelnen Redoxkörpern synergistische oder antagonistische Wechselbeziehungen bestehen könnten.

Bei Zusatz von Glutathion oder Cystein zu einer gepufferten 1 ‰ Dopalösung, die einen Vitamin C oder Araboascorbinbinsäuregehalt von 10 mg% hatte, trat keine Aufhebung der Hemmung der Dopareaktion ein.

Über die Glutation bezw. Cysteinzusätze gibt die Tabelle 9 Auskunft. Die Versuchsbedingungen waren wiederum die gleichen: 20 ccm 1 ‰ Dopalösung, 1 ccm Phosphatpuffer (pH 7,347), 1 ccm Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure mit einem Gehalt von 10 mg% auf die Gesamtlösung berechnet, dazu je 1 ccm Glutathion- bezw. Cystein-Lösung in verschiedenen Konzentrationen.

Tab. 9. Glutathion- bezw. Cystein-Einwirkung auf Vitamin C-Dopalösung.

| mg % | 43,4 | 4,34 | 0,434 | 0,0434 | 0,00434 | 0,000434 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glutathion | | — | — | — | — | — |
| Cystein | — | — | — | — | — | |

Weder Gluthation noch Cystein können also die Vitamin C-Wirkung auf die Dopareaktion ändern.

Die gleichen Ergebnisse hatten auch die Versuche mit einer durch Araboascorbinsäure stabilisierten Dopalösung bei Zusatz von Glutathion und Cystein, sodaß es sich erübrigt, eine besondere Tabelle anzuführen. Die Versuchsbedingungen waren genau die gleichen wie bei Vitamin C-Zusatz.

## 9. Stellungnahme zu unseren Versuchsergebnissen.

Für den Pigmentierungsvorgang ergibt sich nach unseren Versuchen folgendes:

Vitamin C greift nicht in den pigmentbildenden Zellen der Haut, sondern entweder in der Nebenniere selbst, oder im Blute, d. h. auf dem Tansportwege von der Nebenniere zu den pigmentbildenden Zellen in den Pigmentstoffwechsel ein; und zwar schützt es das 3,4 Dioxyphenylalanin, bevor es die Zelle erreicht hat, vor der Oxydation. In der Zelle selbst muß dann ein weiterer Prozeß stattfinden, der diese Stabilisierung wieder rückgängig macht und das Dopa für die Oxydation in den pigmentbildenden Zellteilen freigibt. Nach unseren Untersuchungen könnte Kupfer sehr wohl ein solcher Aktivator sein, der imstande ist, die Hemmung der Dopaoxydation durch Vitamin C wieder aufzuheben.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Uichiro Sarata und Cunningham über die Beziehung des Kupfers zur Pigmentation von großer Bedeutung. Die Autoren konnten nachweisen, daß die Haut unter pigmentierten Haaren mehr Kupfer enthält, als die übrige Haut, die keine pigmentierten Haare besitzt. Sarata hat ferner nachgewiesen, daß die jungen Zellen der Haut, also diejenigen, in denen das Pigment gebildet wird, mehr Kupfer enthalten, als die übrigen Zellen der Haut.

Grüneberg und Schade vermuteten nach ihren Untersuchungen, daß die Hemmung der Dopareaktion auf einer Zerstörung des 3,4 Dioxyphenylalanins beruhe. Gegen eine solche

chemische Umsetzung des Dopas spricht nach unseren Untersuchungen folgendes: Setzt man einer Lösung von Ascorbinsäure+Dopa Kupfersulfat zu, so hemmt das Vitamin C nicht mehr die Dopareaktion und die Oxydation des 3.4 Dioxyphenylalanins tritt ein. Man muß daher annehmen, daß die Dopa in ihrer chemischen Struktur durch Ascorbinsäure nicht verändert, sondern nur durch die spezifische Wirkung des Vitamin C blockiert wird.

Eisen, das zu den lebenswichtigen Bestandteilen des menschlichen Organismus gehört und auch eine Beziehung zum Pigmentstoffwechsel haben soll, übt keinen Einfluß auf den Ablauf der Dopareaktion und die Melaninbildung aus.

Bekanntlich ruft Arsen bei chronischer Verabreichung eine Arsenmelanose der Haut hervor. Deshalb prüften wir auch die Wirkung des Arsens auf die Dopareaktion und fanden, daß Arsen nicht imstande ist, in den Ablauf der Dopareaktion einzugreifen.

Jedoch wäre es bei der Arsenmelanose, die wie gesagt auf einer Vermehrung von pigmentbildungsfähigen Stoffen beruhen soll, denkbar, daß Vitamin C einen Einfluß auf die Melanose ausübt. Besonders müßten Vitamin C-Gaben während der Entstehung der Arsenmelanose depigmentierend wirken, da man annehmen kann, daß Vitamin C die im Überangebot vorliegenden Pigmentvorstufen stabilisiert und so eine weitere Oxydation dieser Stoffe bis zu den farbigen Produkten verhindert.

## 10. Zusammenfassung.

Im Zusammenhang mit dem Befund, daß reines Vitamin C die Dopareaktion hemmt, wurden eine Reihe von anderen körpereigenen Redoxpotentialen auf ihre Wirkung auf die Bloch'sche Reaktion geprüft. In gleicher Weise wurde das Verhalten von Elementen, die Beziehung zur Pigmentbildung haben, untersucht.

Das Ergebnis ist kurz zusammengefaßt folgendes:

1. Araboascorbinsäure, eine der 1. Ascorbinsäure — Vitamin C — homologe Säure hat fast eine ebenso stark hemmende Wirkung auf die Dopareaktion wie das Vitamin C, obgleich die antiskorbutische Wirksamkeit der Araboascorbinsäure nur $^1/_{20}$ der reinen Ascorbinsäure beträgt.

2. Als Ursache der Hemmung der Dopareaktion kann nicht, wie behauptet, das Redoxpotential des Vitamin C bezw. der Araboascorbinsäure angesehen werden, da andere körpereigene Redoxpotentiale wie z. B. Cystein, Glutathion und Laktoflavin keine hemmende Wirkung besitzen. Bei dem Laktoflavin haben wir im Gegenteil eine Beschleunigung im Ablauf der Dopareaktion gesehen.

3. Kupfer, das nach den Untersuchungen des Japaners Uichiro Sarata eine Beziehung zur Pigmentbildung der Haut besitz, wirkt bei der Melaninbildung und bei der Dopareaktion als Katalysator.

4. Ebenso ist Kupfer fähig, bei einer Konzentration von 0,2 mg% die hemmende Wirkung des Vitamin C und der Araboascorbinsäure aufzuheben. Bei einer Konzentration von 0,1 mg%, die ungefähr dem Kupfergehalt des menschlichen Blutes entspricht, hat Kupfer keine eindeutige Wirkung.

5. Eisen und Arsen üben keinen Einfluß auf die Dopareaktion aus. Sie sind ferner nicht imstande, die hemmende Wirkung des Vitamin C bezw. der Araboascorbinsäure aufzuheben.

6. Bei gleichzeitiger Einwirkung von mehreren Redoxkörpern wie Vitamin C bezw. Araboascorbinsäure einerseits und Glutathion bezw. Cystein andererseits konnten keinerlei Wechselbeziehungen in Bezug auf die Beeinflussung der Dopareaktion festgestellt werden.

7. Die Hemmung der Dopareaktion durch das Vitamin C beruht nicht auf einer Zerstörung des 3,4 Dioxyphenylalanins. Durch Zusatz von Kupfer wird nämlich die hemmende Wirkung des Vitamin C aufgehoben. Das 3,4 Dioxyphenylalanin wird also nicht in seiner chemischen Struktur durch das Vitamin C gänzlich verändert.

Die Beziehungen des Vitamin C zum Pigmentstoffwechsel könnte man sich nach unseren Untersuchungen wie folgt vorstellen: Eine Stabilisierung der Pigmentvorstufen durch Vitamin C findet wahrscheinlich in der Nebenniere und im Blute statt. In der pigmentbildenden Zelle der Haut würde nach dieser Anschauung die Stabilisierung durch Kupfer aufgehoben und damit eine Pigmentation eintreten.

---

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Stepp für die liebenswürdige Zuteilung des Themas und die Übernahme des Referats meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Ebenso bin ich Herrn Dr. med. habil. Hermann Schröder für freundliche Anregung und Unterstützung zu Dank verpflichtet.

---

## Literatur.


Abderhalden, Zeitschr. f. Fermentforschung 1934 S. 367 B. 14.
— 1936 Bd. 15, S. 24.
Bloch Br. u. Schrapfl A., Arch. f. Dermat. 1932 Bd. 165, S. 268.
Bloch Br., Arch. f. Dermat. 1917, Bd. 124, S. 129.
Bloch Br. u. Schaaf F., Kliwo 1932 Nr. 1 S. 10.
Cunningham J., Biochem. J. 1931 Bd. 25, S. 1267.
Drigalski W. v., Z. f. Vitaminforschung 1934 Nr. 3, S. 37.
— Kliwo 1934 S. 1354.
— Kliwo 1935 S. 338.
Dalmer O. u. Moll Th., Hoppe Seylers Z. 1933 Bd. 222, S. 116.
Diehl, Dtsch. Arch. Klin. Med. 1933 Bd. 175, S. 177.
Fantl u. Fessler, Kliwo 1935 S. 576.
Gans O., Arch. Derm. Syph. 1930, Bd. 161, S. 607.
Grüneberg Th., Kliwo 1936 Nr. 36 S. 1060.
Grüneberg Th. und Schade, Kliwo 1934 Nr. 38 S. 1353.
Harnapp G. O., Monatsschr. f. Kinderheilkunde Bd. 66, Heft 2 u. 3.
Hoff F., Dtsch. Med Wochenschr. 1936 Nr. 4 S. 129.
Jadassohn, Z. f. Vitaminforschung 1935 Nr. 4, S. 324.
Jadassohn u. Schaaf, Kliwo 1934 S. 845.
Kahler H. u. Croix v. La, Kliwo 1935, S. 1851.
Morawitz P., Kliwo 1934 S. 324.
Mu Jui Wu, Kliwo 1931 S. 547.
Pal, Kliwo 1934 S. 1613.
Peck S S. M., Sobottka H., Kahn J., Kliwo 1932 Nr. 1, S. 14.
Risak, Wiener Kliwo 1930 Nr. 12 S. 358.
Uichiro Sarata, Japanese. J. M. Sc. II Biochem 3 : 79. Nov. 1935.
Schade, Kliwo 1935 S. 60.
Schröder H., Med. Klinik 1934 S. 704.
— Kliwo 1934 Nr. 15 S. 553.
Schröder H. u. Einhauser M., Münch. Med. Wochenschr. 1936 Nr. 23, S. 923.
Sellei J., Fortschritte d. Ther. 1935 Bd. 2, S. 26.

Steff Iiri, Ref.: Zentralbl. f. Haut- und Geschlechtskrankheiten Bd. 60, S. 749.
Szent Györgi, Brit. Med. Journal 1934. 22. Sept. 1934, S. 588.
— Dtsch. Med. Wochenschr. 1932, S. 852.
— Dtsch. Med. Wochenschr. 1934, S. 556.
— Verh. d. 116 Kongr. inn. Med. 1934, S. 426.
Szüle, Dtsch. Med. Wochenschr. 1933, Heft 17, S. 651.
Tenchio F., Kliwo 1934 S. 1511.
Techner, Kliwo 1934 S. 1614.
Teubner, Verh. Med. Gesell. Leipzig 1933.
Tislowitz R., Kliwo 1935 Nr. 46, S. 1641.

## Lebenslauf.

Ich wurde am 4. Juli 1910 in Mainz als Sohn des Lehrers Jakob Wirth geboren. Nach 4-jährigem Besuch der Volksschule in Mainz ging ich an das Realgymnasium in Mainz über, wo ich bis zur Ausweisung der Familie durch die französischen Besatzungsbehörden im Jahre 1923 blieb. Während der Ausweisung besuchte ich das Realgymnasium in Darmstadt. Nach Aufhebung der Ausweisung im Jahre 1925 kehrte ich wieder an das Realgymnasium Mainz zurück und legte dort 1930 meine Reifeprüfung ab. Die ersten 5 Semester studierte ich an der Universität in München, wo ich mich nach einem Semester naturwissenschaftlichen Studiums der Medizin zuwandte, und nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung ablegte. In den folgenden klinischen Semestern studierte ich an den Universitäten Innsbruck, Königsberg und Berlin. Zu den drei letzten Semestern kehrte ich wieder an die Universität München zurück, wo ich auch nach dem 11. Semester die ärztliche Staatsprüfung ablegte. Die Medizinalpraktikantenzeit verbrachte ich an der 1. med. Klinik der Universität München.